

# PAX6 in mammalian degenerative retina

Citation for published version (APA):

Stanescu-Segall, D. (2010). *PAX6 in mammalian degenerative retina*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20101213ds>

**Document status and date:**

Published: 01/01/2010

**DOI:**

[10.26481/dis.20101213ds](https://doi.org/10.26481/dis.20101213ds)

**Document Version:**

Publisher's PDF, also known as Version of record

**Please check the document version of this publication:**

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

**General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

**Take down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

---

# Summary

PAX6 gene is a member of PAX gene family which has a major role in the formation of tissues and organs during development. PAX6 gene encodes PAX6 protein, a transcription factor, acting in the formation of specific organs such as the pancreas, the spinal cord, the brain, the olfactory nerve and the eye.

PAX6 gene is also known as aniridia gene in humans where it was cloned.

PAX6 protein is composed of two DNA-binding domain, a paired domain and a homeodomain. Through DNA binding, PAX6 control the expression of various genes involved in complex regulatory networks in the eye.

Human homozygous PAX6 mutation is lethal shortly after birth resulting in anophthalmia and severe brain malformations. Heterozygous mutations of PAX6 lead to a constellation of pathologies comprising both the anterior and the posterior segment of the eye. They include aniridia, autosomal dominant keratitis, Peters anomaly, juvenile cataract, glaucoma, isolated foveal hypoplasia, microphthalmia, ectopia pupilla, optic disc coloboma, optic nerve hypoplasia and morning glory disc anomaly.

PAX6 gene and its expression are both remarkably conserved throughout evolution, to the point that *PAX6* homolog of *Drosophila* has more than 90% sequence similarity with human PAX6 gene. *Small eye gene (Sey)*, is the murine homolog of PAX6. Like in humans, homozygous mutation is lethal in mice and heterozygous mutations result in a variety of phenotypes similar to human abnormalities.

Exact dosage of PAX6 gene during development is required for normal eye formation. Over expressions of PAX6 gene, as much as underexpression, in mouse and human is also responsible for severe eye pathologies. Similarly when *Eyeless* gene, the *Drosophila* homolog of human PAX6, is injected into the imaginal disc of the developing *Drosophila*, it induced ectopic expression of eyes on the antennae, wings and thorax.

The fundamental role played by PAX6 in eye formation during development and its capacity to trigger activation of a cascades of genes in a coordinated fashion, leading to the development of the eye have lead scientists to call PAX6, the master gene for eye formation.

Despite extensive knowledge of PAX6 gene and its protein during development, little is known about its role in the adult after the end of ocular development.

It has been hypothesized that PAX6 may intervene in the maintenance and protection of adult eye tissues. We were therefore interested to study PAX6 expression in the adult retina of both human and mouse.

We found that PAX6 is expressed at all ages of adulthood in the human retina up to 79 years. PAX6 was predominantly located in the ganglion cell layer and in the inner layer of the retina.

Likewise, we found that PAX6 was expressed in the inner layers of the mouse retina up to 428 days (an old age for a mouse!).

We showed that PAX6 expression was reduced during the peak of photoreceptor apoptosis in *rd* mouse, a mouse model of retinitis pigmentosa. Similarly, wild-type mice disclosed decreased PAX6 expression in the retina of light-induced retinal degeneration mice. Conversely, PAX6 expression was increased in c-fos knock-out mice showing resistance to light induced retinal degeneration.

In a mouse model of acute angle-closure glaucoma, CLR<sup>SM $\alpha$ A</sup> mouse, intraocular pressure increased between p22 to p82 to over two times higher levels than in control mice resulting in apoptosis of the cells of the inner retina. We showed that there was first, a progressive decrease in cell number of the inner retina including PAX6 expressing cells in the ganglion cell layer. Later, a significant increase of PAX6 expressing cells concomitant with an overall loss of cells was observed in the inner retina layer of CLR<sup>SM $\alpha$ A</sup> mouse.

Our results confirmed that PAX6 was found in both healthy and degenerative adult mammalian retina. These findings were in accordance with the presence of PAX6 in adult cornea of mice and humans. PAX6 helps to maintain the normal cornea phenotype and plays an important role during repair of corneal epithelium in case of physical aggression.

We speculated that PAX6 has a protective role in the degenerating outer retina through an activation of Müller glial cells who might be capable to produce retinal progenitor cells and hence all

In the same manner, when ganglion cell layer is massively disrupted in CLR<sup>SM $\alpha$ A</sup> mouse, there was an increase of PAX6 INL expressing cells that could be related to remodeling process involving Müller cells.

We assumed that PAX6 plays a crucial role in the maintenance and protection during adulthood.

To confirm our hypothesis, it would be interesting to suppress PAX6 gene in an adult retina. Since PAX6 knockout mice are lethal right after birth, inducible PAX6 knock-out mice would be an elegant solution to investigate the exact function of PAX6 after the end of ocular development.

---

## Samenvatting (Summary in Dutch)

Het PAX6-gen behoort tot de PAX genfamilie, die een belangrijke rol speelt bij de vorming van weefsels en organen gedurende de embryonale ontwikkeling. Het PAX6-gen codeert voor het PAX6-eiwit, een transcriptie factor, die actief betrokken is bij de vorming van specifieke organen zoals de pancreas, het rug-genmerg, de hersenen, de oogzenuw en het oog.

Het PAX6-gen staat bij de mens ook bekend als het aniridie gen vanwege het feit dat het als kandidaat gen voor deze ziekte werd gekloneerd.

Het PAX-6 eiwit bestaat uit twee DNA-bindende domeinen, een "Paired domein" en een "Homeodomein". Door binding aan het DNA controleert PAX6 de expressie van verschillende genen die betrokken zijn bij complexe regelnetwerken in het oog.

Bij de mens is homozygotie voor de PAX6 mutatie kort na de geboorte lethaal. Deze gaat gepaard met anophthalmie en ernstige hersenafwijkingen. Heterozygote mutaties van PAX6 leiden tot een combinatie van oogafwijkingen die zowel de voorste als de achterste oogkamer kunnen omvatten. Deze betreffen onder andere aniridie, autosomaal dominante keratatis, Peters anomalie, juveniele cataract, glaucoma, geïsoleerde foveale hypoplasie, microphthalmie, ectopia pupilla, optische papil coloboom, oogzenuw hypoplasie and morning glory papil.

Het PAX6 gen en de expressie ervan zijn opmerkelijk geconserveerd tijdens de evolutie. Zo is er meer dan 90% overeenkomst tussen de gensequentie van de PAX6 homoloog bij *Drosophila* en de volgorde van het PAX6 gen bij de mens. *Small eye gene (Sey)* is het homologe gen van PAX6 bij de muis. Beide genen vertonen grote overeenkomsten. Ook bij de muis is de homozygote mutatie lethaal terwijl de aanwezigheid van heterozygote mutaties leidt tot een scala aan afwijkende fenotypes dat veel gelijkenis vertoont met dat bij de mens.

Voor een normale oogontwikkeling is een exacte dosering van de PAX6 gen-expressie gedurende de embryonale ontwikkeling vereist. Zowel over- als onderexpressie van het PAX6-gen, zijn zowel bij muis als mens verantwoordelijk voor de vorming van ernstige oogafwijkingen. Ook leidt de injectie van het *Eyeless* gen, dat het homologe gen van PAX6 bij *Drosophila* is, in groepjes ongedifferentieerde cellen van *Drosophila* larven, tot ectopische expressie en de vorming van ogen op de antennen, de vleugels en de thorax.

De fundamentele rol die PAX6 speelt bij de oogontwikkeling tijdens de embryonale ontwikkeling en het vermogen om een cascade aan genen, en daarmee de oogontwikkeling, op een gecoördineerde manier te activeren heeft ertoe geleid dat PAX6, het “master” gen voor de oogontwikkeling wordt genoemd.

Ondanks het feit dat veel bekend is over de rol van het PAX6-gen en zijn eiwit gedurende de embryonale ontwikkeling is weinig bekend over de rol bij de volwassene na het afsluiten van de oogontwikkeling.

Men heeft verondersteld dat PAX6 betrokken zou kunnen zijn bij het handhaven en beschermen van de weefsels in het volwassen oog. We waren daarom geïnteresseerd om de PAX6 expressie te bestuderen in de volwassen retina van zowel mens als muis.

We vonden daarbij dat PAX6 expressie bij de mens kan worden waargenomen op alle leeftijden (tot en met 79 jaar). PAX6 was vooral gelokaliseerd in de ganglion cellaag en de binnenste laag van de retina.

Overeenkomstig hiermee werd bij de muis waargenomen dat PAX6 tot expressie kwam in de binnenste lagen van muis retina van de muis tot op een leeftijd van 428 dagen (hetgeen erg oud is voor een muis!).

We hebben aangetoond dat PAX6 expressiegereduceerd was tijdens de piek van de phoreceptor apoptose in de *rd* muis, het muismodel van retinitis pigmentosa. Overeenkomstig hiermee lieten wild-type muizen een verlaagde PAX6 expressie zien in de retina of licht-geïnduceerde retinale degeneratie. Daar staat tegenover dat de PAX6 expressie was toegenomen in c-fos knock-out muizen die weerstand tonen tegen licht-geïnduceerde retinale degeneratie.

In een muis model van acuut kamerhoek glaucoom, de CLR<sup>SM $\alpha$ A</sup> muis, was de intraoculaire druk toegenomen van p22 tot p82 tot twee keer hogere waarden dan in controle muizen hetgeen apoptose van cellen in de binnenste retina tot gevolg had. We hebben aangetoond dat er eerst sprake was van een progressieve afname van het aantal cellen in de binnenste retina waaronder ook de PAX6 expresserende cellen van de ganglioncellaag. Later, was er een significante toename van de PAX6 expresserende cellen tegelijk met een verlies van cellen in de binnenste retina laag van de CLR<sup>SM $\alpha$ A</sup> muis.

Onze resultaten bevestigen dat PAX6 zowel aanwezig is in de gezonde als in de degeneratieve retina van volwassen zoogdieren. Deze bevindingen komen overeen met de aanwezigheid van PAX6 in de cornea van volwassen muizen en mensen. PAX6 helpt bij het handhaven van het normale cornea fenotype en speelt een belangrijke rol tijdens het herstel van het cornea epitheel in geval van fysieke beschadiging.

We veronderstellen PAX6 een beschermende functie heeft in de degenererende buitenste retina door een activatie van Müller glia cellen die in staat zouden kunnen zijn retinale voorloper cellen te produceren.

Op dezelfde manier werd waargenomen dat wanneer de ganglion cellaag ernstig beschadigd werd in de CLR<sup>SMαA</sup> muis, er sprake was van een toename van PAX6 INL expresserende cellen hetgeen verband kan houden met de betrokkenheid van Müller cellen bij dit remodeling proces.

We nemen aan dat PAX6 een cruciale rol speelt bij het handhaven en beschermen bij volwassenen.

Om deze hypothese te bevestigen zou het interessant zijn om het PAX6-gen te onderdrukken in de volwassen retina. Omdat PAX6 knockout muizen kort na de geboorte lethaal zijn, zouden induceerbare PAX6 knock-out muizen een elegante oplossing kunnen bieden bij het onderzoek naar de exacte functie van PAX6, na het afsluiten van de oogontwikkeling.